

# Caracterização Fenotípica e Genética da Virulência de *Pyricularia grisea* em Cultivares de Arroz Irrigado no Estado do Tocantins

Anne Sitarama Prabhu  
Marta Cristina Filippi  
Josias Corrêa de Faria  
Leila Garcês de Araújo



# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 11***

## **Caracterização Fenotípica e Genética da Virulência de *Pyricularia grisea* em Cultivares de Arroz Irrigado no Estado do Tocantins**

Anne Sitarama Prabhu  
Marta Cristina Filippi  
Josias Corrêa de Faria  
Leila Garcês de Araújo

Santo Antônio de Goiás, GO  
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Arroz e Feijão**

Rodovia Goiânia a Nova Veneza Km 12 Zona Rural  
Caixa Postal 179  
75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO  
Fone: (62) 533 2123  
Fax: (62) 533 2100  
www.cnpaf.embrapa.br  
sac@cnpaf.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Carlos Agustin Rava*  
Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*  
*Aloisio Sartorato*  
*Valácia Lemes da S. Lobo*

Supervisor editorial: *Marina A. Souza de Oliveira*  
Normalização bibliográfica: *Ana Lucia D. de Faria*  
Capa: *Sebastião José de Araújo*  
Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

**1ª edição**

1ª impressão (2004): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Arroz e Feijão

---

Caracterização fenotípica e genética da virulência de *Pyricularia oryzae* em cultivares de arroz irrigado no Estado do Tocantins / Anne Sitarama Prabhu ... [et al.]. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2004.

32 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9601 ; 11)

1. Arroz – Brusone. 2. Marcador Molecular. I. Prabhu, Anne Sitarama. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

---

CDD 633.1894 (21. ed.)

© Embrapa 2004

# Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Resumo .....</b>                     | <b>5</b>  |
| <b>Abstract .....</b>                   | <b>7</b>  |
| <b>Introdução .....</b>                 | <b>9</b>  |
| <b>Material e Métodos .....</b>         | <b>10</b> |
| Isolados .....                          | 10        |
| Análise de virulência .....             | 11        |
| Extração de DNA .....                   | 11        |
| Primers .....                           | 12        |
| Amplificação de DNA .....               | 12        |
| <b>Resultados e Discussão .....</b>     | <b>13</b> |
| Metica-1 .....                          | 13        |
| Epagri 108 e Epagri 109 .....           | 19        |
| <b>Conclusões .....</b>                 | <b>27</b> |
| <b>Referências Bibliográficas .....</b> | <b>27</b> |



# Caracterização Fenotípica e Genética da Virulência de *Pyricularia grisea* em Cultivares de Arroz Irrigado no Estado do Tocantins

---

*Anne Sitarama Prabhu<sup>1</sup>*

*Marta Cristina Filippi<sup>2</sup>*

*Josias Corrêa de Faria<sup>3</sup>*

*Leila Garcês de Araújo<sup>4</sup>*

## Resumo

A brusone é um dos fatores limitantes da produção do arroz de várzea no Estado do Tocantins. Foram determinadas as diversidades fenotípica e genética em populações de *Pyricularia grisea*, coletadas em quatro lavouras da cultivar Metica-1 e nove lavouras das cultivares Epagri 108 e Epagri 109, sob condições de epidemia de brusone nas folhas. Foi analisado o padrão de virulência dos isolados através de inoculações artificiais em 32 genótipos incluindo as diferenciadoras internacionais, em casa de vegetação. A análise molecular dos isolados foi realizada utilizando rep-PCR para amplificação das seqüências entre os elementos repetitivos Pot2.

Nas lavouras de Metica-1, dentro da população composta por 80 isolados, foram identificados dois grupos, considerando 80% de similaridade em virulência, independentemente do local onde foram coletados. Oitenta por cento dos isolados pertencem ao patótipo ID-14, indicando alta especificidade da cultivar e

---

<sup>1</sup> *Biólogo, Ph.D. em Fitopatologia, Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, CEP 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO. prabhu@cnpaf.embrapa.br*

<sup>2</sup> *Engenheira Agrônoma, Ph.D. em Genética e Melhoramento, Embrapa Arroz e Feijão cristina@cnpaf.embrapa.br*

<sup>3</sup> *Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Fitopatologia/Biotecnologia, Embrapa Arroz e Feijão. josias@cnpaf.embrapa.br*

<sup>4</sup> *Engenheiro Agrônoma, Doutora em Genética e Melhoramento, Professora da Universidade Estadual de Goiás (UEG), BR 153, Km 98 Caixa postal 459, Anápolis-GO.*

pouca diversidade em virulência. A análise dos isolados de *P. grisea*, utilizando rep-PCR, revelou a ocorrência de seis grupos com similaridade variando de 0,09 a 1. Não houve uma relação entre o agrupamento baseado na análise genética e na virulência dos isolados.

Dois grupos distintos de bandas polimórficas foram identificados entre os 53 isolados, coletados em nove lavouras comerciais de Epagri 108 e Epagri 109. O dendrograma analisando os dados de virulência fenotípica permitiu distinguir apenas um grupo, considerando o nível de similaridade de 77%. O patótipo predominante IB-45 foi representado por 47 dos 53 isolados, correspondendo a 88,7%. Foram identificados quatro patótipos (IB-1, IB-9, IB-13 e IB-41) entre os isolados coletados nessas duas cultivares. Não houve relação entre o agrupamento genético e os patótipos identificados. A epidemia da brusone nas cultivares Epagri 108 e Epagri 109 um ano após o lançamento pode ser atribuída ao surgimento do patótipo IB-45, ou à sua preexistência em baixa frequência, seguido de um rápido aumento no campo.

Os resultados ainda demonstraram que os isolados de *P. grisea*, provenientes de lavouras comerciais de arroz das cultivares Metica-1, Epagri 108 e Epagri 109 apresentaram estreita diversidade fenotípica e genética.

Palavras Chave: *Magnaporthe grisea*, *Oryza sativa*, brusone, marcador molecular, análise de rep-PCR, patótipo.



# *Pyricularia grisea* Characterization for Phenotypic and Genetic Virulence in Irrigated Rice Cultivars in the State of Tocantins

---

## Abstract

*Rice blast is a major yield constraint of the irrigated rice in the State of Tocantins, Brazil. The phenotypic and genetic diversity of *Pyricularia grisea* populations, collected from four individual farms of rice cultivar Metica-1 and nine commercial farms of Epagri 108 and 109, under epidemic conditions of leaf blast was studied. Rep-PCR analysis of isolates was done by using two primer sequences from Pot2. The virulence pattern of isolates retrieved from these cultivars was analyzed in artificial inoculation tests in the greenhouse utilizing 32 genotypes including international differentials.*

*In commercial farms of Metica-1 the 80 isolates were divided into two groups considering 80% of similarity in virulence, independent of the collection site. Eighty percent of the isolates pertained to pathotype ID-14, indicating high cultivar specificity and narrow diversity of virulence in the sample population. Analysis of *P. grisea* isolates using rep-PCR revealed the occurrence of six groups with similarities ranging from 0.09 to 1. There was no straight relationship between Grouping based on genetic analysis and virulence of these isolates.*

*Two distinct groups were identified among 53 isolates collected from nine different commercial fields of Epagri 108 and Epagri 109. A dendrogram constructed from virulence phenotype data showed a single group considering 77% similarity level. The predominant pathotype IB-45 was represented by 47 of the 53 isolates corresponding to 88.7%. Four other pathotypes (IB-1, IB-9,*

*IB-13 and IB-41) were identified among the isolates from these cultivars. There was no relation between rep-PCR grouping and pathotypes. The blast outbreak on these two cultivars one year after their introduction could be attributed to the appearance of the pathotype IB-45 or its increase which was hitherto existing in a low frequency.*

*The results showed that the isolates of *P. grisea* recovered from cultivars Metica-1, Epagri 108 and Epagri 109 in farmers' fields had narrow phenotypic and genetic diversity.*

Index terms: *Magnaporthe grisea*, *Oryza sativa*, rice blast, molecular markers, rep-PCR analysis, pathotype.

## Introdução

A brusone causada por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. [= *Magnaporthe grisea* (T.T.Herbert) Yaegashi & Udagawa] é a doença fúngica mais destrutiva do arroz irrigado, no Estado do Tocantins. A cultivar Metica-1 possui alto potencial de produtividade e vem sendo plantada anualmente em áreas extensas e contíguas, desde seu lançamento em 1984, porém é suscetível à brusone. Embora não existam estimativas precisas quanto às perdas causadas por esta enfermidade na cultivar Metica-1, sabe-se que são significativas, segundo comunicação pessoal com produtores. Alta tecnologia envolvendo doses elevadas de nitrogênio, aplicações de herbicidas, fungicidas e inseticidas visam a maximizar a produtividade, porém aumentam o custo de produção e diminuem os lucros. A resistência à doença constitui o principal componente no manejo da brusone, e as pesquisas estão em andamento para desenvolver cultivares resistentes.

As cultivares Epagri 108 (17719/5738/IR 21015-72-3-3-3-1) e Epagri 109 (CT7347/IR 21015-72-3-3-3-1) introduzidas do Estado de Santa Catarina apresentaram alto potencial de produtividade, qualidade de grão superior e resistência à brusone. Essas duas cultivares ocuparam aproximadamente 20.000 hectares nos municípios da Lagoa da Confusão e Duerê. A primeira ocorrência de brusone na fase vegetativa nessas cultivares foi registrada durante a safra 1998/99 em diferentes lavouras, indicando a quebra da resistência dessas duas cultivares um ano após seu lançamento (Prabhu & Filippi, 1999). A quebra freqüente da resistência nas cultivares comerciais é atribuída à alta variabilidade patogênica de *P. grisea* (Ou, 1980).

Estratégias para incorporação de genes de resistência efetivos contra as diferentes populações do patógeno requerem estudos quanto à virulência dessas populações. A caracterização das populações de *P. grisea* é normalmente feita pelo método convencional de identificação de raças, baseando-se na reação de uma série de cultivares diferenciadoras (Atkins et al., 1967) e na aplicação de ferramentas moleculares, como DNA-fingerprinting.

O fungo causador da brusone é composto de patótipos, ou raças fisiológicas, com características de virulência distintas. A maioria dos estudos conduzidos no Brasil e em outros países concentraram-se na determinação e composição de raças, na sua freqüência de ocorrência e na sua compatibilidade com genes de resistência conhecidos (Amaral et al., 1979; Bonman et al., 1987; Ribeiro & Terres, 1987; Prabhu & Filippi, 1989; Urashima & Isogawa, 1990; Correa-Victoria & Zeigler,

1993; Filippi et al., 1999). Tem sido relatada uma variação patogênica em isolados monospóricos provenientes de uma única lesão (Ou & Ayad, 1968; Bedendo et al., 1979), enquanto outros estudos mostraram que isolados monospóricos são estáveis em patogenicidade (Giatgong & Frederiksen, 1969; Bonman et al., 1987). A diversidade patogênica é geralmente alta em campos experimentais e nos locais de testes de seleção para melhoramento de cultivares (Correa-Victoria & Zeigler, 1993; Zeigler et al., 1995; Filippi et al., 1999). Entretanto, não existem ainda informações disponíveis no Brasil sobre a diversidade das populações do patógeno nas condições naturais de infecção, em lavouras comerciais onde há pouca ou nenhuma alo-infecção.

À medida que informações sobre a diversidade fenotípica e genética de populações de *P. grisea* tornam-se disponíveis, o valor do uso destas informações aumenta em potencial. Hoje, a caracterização da diversidade genética de populações de *P. grisea* está sendo feita utilizando técnicas moleculares. Os isolados de *P. grisea*, indivíduos que compõem uma população, têm sido agrupados em linhagens distintas depois da análise de RFLP-DNA Fingerprinting, utilizando-se a sonda MGR586 (Hamer, 1991; Levy et al., 1991, 1993; Zeigler et al., 1995; Filippi et al., 1999). Porém, devido às dificuldades no uso de análise RFLP em larga escala, a técnica de rep-PCR com dois primers, *Pot1* e *Pot2*, tem sido mais utilizada. *Pot1* é uma seqüência repetitiva de *Fusarium oxysporum*, e *Pot2* é um elemento repetitivo obtido de *P. grisea* e similar em estrutura à sonda MGR 586. A comparação dos resultados obtidos com a amplificação feita com *Pot2* rep-PCR e a amplificação RFLP-DNA MGR586 mostraram que os agrupamentos foram similares (George et al., 1998).

O objetivo da presente investigação foi estudar a diversidade fenotípica e genética dentro das populações do patógeno *P. grisea*, coletadas em quatro lavouras da cultivar Metica-1 e em nove lavouras de Epagri 108 e Epagri 109, sob condições de epidemia.

## Material e Métodos

### Isolados

Os isolados de *P. grisea* da cultivar Metica-1 foram coletados de quatro lavouras individuais, duas na Lagoa da Confusão (I e IV) e duas do projeto Rio Formoso (II e III), localizadas à distância de aproximadamente 200 km, no Estado do Tocantins, durante a safra de 1996/97. Por outro lado, os isolados das cultivares Epagri 108 e Epagri 109 foram obtidos de nove lavouras plantadas durante a

safrá 1998/99, no município da Lagoa da Confusão. Isolados monospóricos obtidos a partir de lesões esporulativas foram mantidos em discos de papel de filtro esterilizados (Prabhu & Filippi, 2001).

## **Análise de virulência**

A virulência fenotípica de 87 isolados coletados da cultivar Metica-1, sendo 22, 25, 18 e 22 das lavouras I, II, III e IV, respectivamente, e 53 isolados coletados das cultivares Epagri 108 e Epagri 109, foi testada em 32 genótipos, incluindo 19 cultivares comerciais irrigadas, cinco linhas quase isogênicas de CO39 e as diferenciadoras internacionais. Dezesesseis genótipos por bandeja plástica (30x15x10 cm) contendo 3 kg de solo adubado com 5 g de NPK (4-30-16), 1 g de sulfato de zinco e 2 g de sulfato de amônio por ocasião do plantio. Foi feita uma adubação de cobertura, 20 dias após a semeadura, com 2 g de sulfato de amônio. Dez a doze sementes de cada genótipo foram semeadas em linhas de 5 cm. As inoculações, na casa de vegetação, foram feitas em plantas com 21 dias de idade, utilizando uma suspensão de esporos contendo  $3 \times 10^5$  esporos/mL. A avaliação da doença foi feita sete a nove dias após a inoculação, utilizando uma escala visual, onde os graus 0, 1 e 3 indicam reações incompatíveis, e os graus 4, 5, 7 e 9 reações compatíveis de acordo com Leung et al. (1988). A frequência de virulência foi determinada com base no número total de reações compatíveis nos 32 genótipos. No caso de reações ambíguas ou intermediárias, os testes de inoculação foram repetidos quando necessário, e as reações consistentes e uniformes foram utilizadas para análise. Os patótipos foram determinados com base no tipo de reação nas oito diferenciadoras internacionais.

A frequência de virulência dos isolados foi baseada na similaridade da reação entre os isolados. Uma matriz binária de análise de virulência fenotípica foi criada, considerando-se o valor 1 para reação compatível e o valor 0 para reação incompatível, usando-se o coeficiente de Jaccard. Estes dados foram utilizados para calcular os coeficientes de similaridade e construir os dendrogramas usando o método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA) e o programa SAHN de análise numérica (NTSYS-pc, versão-1.70/1992).

## **Extração de DNA**

Um ou dois discos de papel contendo micélio dos isolados foram transferidos para frascos de erlenmeyers contendo 150 mL de meio de cultura (10 g de dextrose suplementada com 2 g de extrato de levedura por litro), permanecendo quatro dias sem agitação, seguidos por dez dias com agitação constante no escuro, em temperatura ambiente.

A extração de DNA foi realizada utilizando o método modificado de Raeder & Broda (1985). O micélio foi secado e congelado, seguido de liofilização e maceração em nitrogênio líquido. Aproximadamente 300 mg de micélio foi colocado em 700 µl de tampão de extração (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA; 3% sulfato de dodecyl sódio, massa/vol e 1% de mercaptoetanol) a 65°C durante pelo menos uma hora. As proteínas foram precipitadas com 30 µl de acetato de potássio (3M e pH = 5.2). O DNA foi precipitado em 200 µl de isopropanol gelado, lavado com etanol (70%), secado a vácuo e ressuspensionado em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1.0 mM EDTA), contendo 10 mg/mL de RNAase e incubado a 37°C durante 30 minutos. A concentração de DNA foi medida em fluorômetro e ajustada para 10 ng/µl.

## Primers

As seqüências de oligonucleotídeos foram baseadas na seqüência do primer do elemento repetitivo *Pot2* (EMBL acesso Z33638), um transposon repetido invertido com aproximadamente 100 cópias no genoma do fungo *P. grisea* (Kachroo et al., 1994). Os dois primers (*Pot2-1* 5´ CGGAAGCCCTAAAGCTGTTT 3´ e *Pot2-2* 5´ CCCTCATTCGTACACGTTT 3´) foram desenhados de cada extremidade do *Pot2* na orientação oposta, tal que as extremidades 3´ são dirigidas a partir do externo de cada elemento. As seqüências de oligonucleotídeos foram sintetizadas pela Universidade Federal do Paraná, Brasil.

## Amplificação de DNA

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams et al. (1990). A amplificação enzimática foi feita em um termociclador (M.J. Research, Inc.), programado para 40 ciclos. Cada ciclo foi composto por 15 segundos a 94°C; 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C. Após 40 ciclos, foi realizada uma extensão por 7 minutos a 72°C. Os fragmentos gerados por amplificação foram separados por eletroforese em géis de agarose contendo 5 µl de uma solução de brometo de etídio a 1%. A concentração da agarose foi de 1,4% em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM e EDTA 2 mM). Posteriormente, os géis foram fotografados sob luz ultra violeta, utilizando-se o sistema de fotodocumentação Eagle Eye II (Stratagene).

Análise dos dados - Os perfis de bandas foram analisados com base na presença (1) ou ausência (0) dos produtos de mesmo comprimento. Os dados foram analisados usando o programa NTSYS, versão-1.70/1992. As distâncias genéticas foram calculadas pelo coeficiente de similaridade de Jaccard. Uma matriz de distâncias genéticas foi usada para a análise de agrupamento dos isolados e construção do dendrograma, com base no método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA).

## Resultados e Discussão

### Metica-1

Dos 87 isolados de *P. grisea* coletados em quatro lavouras de Metica-1, 70 pertenceram ao patótipo ID-14 (Tabela 1). A ocorrência do patótipo ID-14 em Metica-1 foi relatada em estudos anteriores, em uma amostra coletada no município de Formoso do Araguaia, em 1986 (Filippi et al., 1999). Dez isolados foram identificados como patótipo ID-16, dois isolados como II-1, e um isolado para cada um dos patótipos IB-33, IB-45, IB-46, IG-2 e IA-112, respectivamente. Estes patótipos foram obtidos aleatoriamente, de diferentes lavouras. Os patótipos IG-2 e IB-45 foram identificados a partir de isolados coletados da cv. CICA-8, no viveiro nacional de brusone por Filippi et al. (1999). Estes patótipos também foram encontrados entre os isolados coletados de lesões nas folhas da cv. Metica-1, em uma única lavoura (IV).

**Tabela 1.** Frequência de patótipos dos isolados de *Pyricularia grisea* coletados em lavouras de arroz comerciais da cultivar Metica-1.

| Patótipo <sup>(1)</sup> | Lavoura I | Lavoura II | Lavoura III | Lavoura IV | Número total de isolados |
|-------------------------|-----------|------------|-------------|------------|--------------------------|
| ID-14                   | 21        | 19         | 13          | 17         | 70 (80,5) <sup>(2)</sup> |
| ID-16                   | -         | 3          | 5           | 2          | 10 (11,5)                |
| IB-33                   | -         | 1          | -           | -          | 1 (1,1)                  |
| IB-45                   | -         | -          | -           | 1          | 1 (1,1)                  |
| IB-46                   | -         | 1          | -           | -          | 1 (1,1)                  |
| IG-2                    | -         | -          | -           | 1          | 1 (1,1)                  |
| II-1                    | 1         | -          | -           | 1          | 2 (2,3)                  |
| IA-112                  | -         | 1          | -           | -          | 1 (1,1)                  |
| Total <sup>(3)</sup>    | 22        | 25         | 18          | 22         | 87                       |

<sup>(1)</sup>Patótipos determinados com base na reação das oito diferenciadoras internacionais; <sup>(2)</sup> Os valores entre parênteses indicam porcentagens; <sup>(3)</sup> Número total de isolados.

A frequência da virulência de isolados de *P. grisea* em 18 genótipos de arroz irrigado variou de 4 a 100% (Tabela 2). Não foram detectadas diferenças no padrão de virulência em isolados coletados de diferentes lavouras. Todos os isolados coletados foram virulentos na cv. Metica-1. Entretanto, os isolados obtidos da cv. Metica-1 apresentaram frequência muito baixa de virulência nas cultivares comerciais Rio Formoso, BR-IRGA 409 e Aliança, bem como nas cultivares introduzidas como Tetep e Basmati-370. Foram altas as frequências de virulência dos isolados nas cultivares IR-50, IR-5, Colômbia-1, Maratelli e Yachiro Mochi.

**Tabela 2.** Frequência de virulência de isolados de *Pyricularia grisea*, coletados de quatro lavouras comerciais de arroz, cultivar Metica-1, quando inoculados em genótipos de arroz irrigado.

| <i>Cultivares</i>        | <i>Lavoura I</i>       | <i>Lavoura II</i> | <i>Lavoura III</i> | <i>Lavoura IV</i> |
|--------------------------|------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Metica-1                 | 22(100) <sup>(1)</sup> | 25(100)           | 18(100)            | 22(100)           |
| Aliança                  | 0(0)                   | 1(4)              | 0(0)               | 0(0)              |
| Rio Formoso              | 1(4,5)                 | 1(4)              | 2(11,1)            | 2(9,1)            |
| BR IRGA 409              | 0(0)                   | 1(4)              | 1(5,5)             | 0(0)              |
| Cica-8                   | 0(0)                   | 1(4)              | 0(0)               | 0(0)              |
| Cica-9                   | 0(0)                   | 1(4)              | 0(0)               | 0(0)              |
| Colômbia-1               | 19(86)                 | 20(80)            | 16(88,8)           | 16(72,7)          |
| Basmati-370              | 0(0)                   | 1(4)              | 0(0)               | 0(0)              |
| IR-5                     | 22(100)                | 25(100)           | 18(100)            | 21(95,5)          |
| IR 50                    | 22(100)                | 24(96)            | 18(100)            | 22(100)           |
| Tetep                    | 0(0)                   | 1(4)              | 0(0)               | 0(0)              |
| TKM                      | 4(18,2)                | 7(28)             | 4(22,2)            | 4(18,2)           |
| Bluebelle                | 4(18,2)                | 3(10,7)           | 3(16,6)            | 3(13,6)           |
| BL 1                     | 1(4,5)                 | 2(8)              | 3(16,6)            | 0(0)              |
| Kasube                   | 5(22,7)                | 10(40)            | 2(11,1)            | 0(0)              |
| Labelle                  | 6(27,2)                | 20(80)            | 14(72,2)           | 7(31,8)           |
| Maratelli                | 22(100)                | 25(100)           | 18(100)            | 22(100)           |
| Yachiro Mochi            | 21(95,5)               | 24(96)            | 18(100)            | 19(86,4)          |
| Número total de isolados | 22                     | 25                | 18                 | 22                |

<sup>(1)</sup>Valores entre parênteses indicam porcentagem.

A incompatibilidade de isolados de Metica-1, na cv. CICA-8, foi consistente, exceto para o único patótipo IB-33 coletado da lavoura II. Este patótipo, de rara ocorrência, coletado da população de campo da cv. Metica-1, mostrou-se virulento em 28 das 32 cultivares testadas. Anteriormente, Filippi et al. (1999) demonstraram que os isolados compatíveis com Metica-1 são incompatíveis com a cv. CICA-8, mas a análise dos resultados do presente trabalho mostrou que dois isolados raros ocorrem em populações no campo. Estes isolados também são virulentos à cv. Tetep e esta, supostamente, possui um amplo espectro de resistência e vem sendo utilizada como fonte de resistência em diferentes países, inclusive no Brasil.

Estes resultados mostraram a pré-existência de genes de virulência na população do patógeno, indicando que a resistência de novas cultivares lançadas torna-se inefetiva com o tempo. Nos estudos de dinâmica de populações de *Phytophthora infestans*, o gene de virulência R4 pré-existia, embora este gene específico nunca tenha sido utilizado pelos melhoristas para resistência da batata inglesa a este patógeno (Van Der Plank, 1982).



Foram detectados isolados virulentos e avirulentos na amostragem da população de *P. grisea* analisados com os genes conhecidos (*Pi-3*, *Pi-4a* e *Pi-4b*) das linhagens quase isogênicas (NILS, Tabela 3). Foram raros os isolados com virulência às linhagens isogênicas C101LAC (*Pi-1*) e C101A51 (*Pi-2*). Dois isolados, um da lavoura II e um da lavoura IV, foram virulentos aos genes *Pi-1*. Da mesma maneira, um isolado da lavoura II e dois isolados da lavoura III foram virulentos ao gene *Pi-2*. O patótipo IB-33 apresentou virulência a ambos os genes *Pi-1* e *Pi-2*.

**Tabela 3.** Virulência de isolados de *Pyricularia grisea* coletados de quatro lavouras comerciais de arroz, cultivar Metica-1, quando inoculados nas linhas isogênicas do pai suscetível CO39.

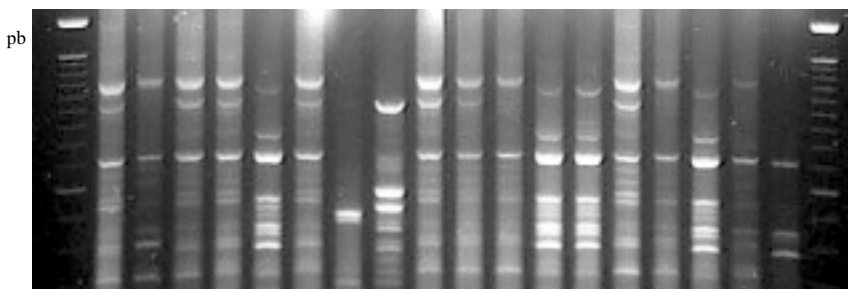
| Linhas quase isogênicas  | Genes de Resistência | Número de isolados virulentos |            |             |            |
|--------------------------|----------------------|-------------------------------|------------|-------------|------------|
|                          |                      | Lavoura I                     | Lavoura II | Lavoura III | Lavoura IV |
| C101LAC                  | <i>Pi-1</i>          | 0                             | 1          | 0           | 1          |
| C101A 51                 | <i>Pi-2</i>          | 0                             | 1          | 2           | 0          |
| C104PKT                  | <i>Pi-3</i>          | 22                            | 25         | 18          | 22         |
| C101PKT                  | <i>Pi-4a</i>         | 22                            | 25         | 18          | 22         |
| C105TTP4L23              | <i>Pi-4b</i>         | 22                            | 25         | 18          | 22         |
| CO39                     |                      | 22                            | 25         | 18          | 22         |
| Número total de isolados |                      | 22                            | 25         | 18          | 22         |

Estes resultados mostram que a incorporação de genes de resistência aos genes de avirulência *Pi-1* e *Pi-2* em cultivares de arroz irrigado serão efetivos contra o patótipo ID-14; porém é importante esclarecer que isto não garante estabilidade destes genes de resistência, porque já existem indivíduos nas populações de campo que expressam genes de virulência em baixa frequência. Piramidar estes dois genes em uma cultivar possivelmente contribuirá para uma maior durabilidade da resistência.

As similaridades da virulência fenotípica em 32 genótipos *Oryza sativa* são mostradas no dendrograma apresentado na Figura 1. Dois grupos compostos de 81 isolados, de um total de 87 isolados foram identificados considerando 80% de similaridade. Foi identificado um terceiro grupo composto de seis isolados com valores de coeficientes de similaridade variando de 0,48 a 1,0. Os patótipos IA-12, IB-45, IB-16, ID-16, IG-2, II-1, além de ID-14 foram distribuídos nos grupos I e II, enquanto os patótipos IB-33 e II-1 no grupo III, por terem apresentado grande dissimilaridade dos demais isolados.

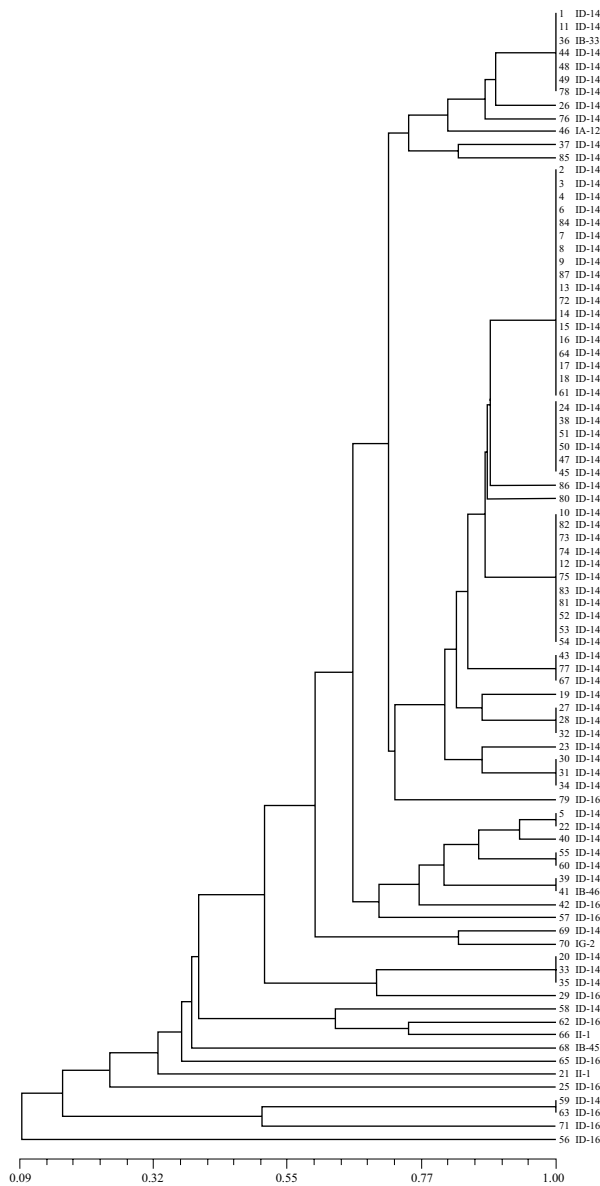


Os perfis de rep-PCR de 19 dos 87 isolados testados encontram-se na Figura 2. Os isolados apresentaram diferenças e similaridade no padrão de bandas, variando de 1 a 9 fragmentos de 200 a 1300 bp em comprimento. Os isolados 19 a 36 representam quatro diferentes patótipos, II-1 (21), ID-16 (25 e 29), IB-33 (36) e ID-14 (19). Estes isolados foram coletados da cv. Metica-1, em duas lavouras diferentes (19 a 22 da lavoura I e 23 a 36 da lavoura II); 14 deles foram similares ao isolado de referência 19 (ID-14). Entretanto, isolados pertencentes ao mesmo patótipo, como ID-14, mostraram número variável de bandas com certo grau de polimorfismo. Foi possível diferenciar os patótipos ID-14 de IB-33 (36) e de ID-16 (25 e 29). Em cada um deles, quatro a seis isolados com fragmentos específicos foram utilizados para diferenciar os isolados pertencentes a ID-14. Embora os isolados 25 e 29 tenham sido identificados como ID-16, eles mostraram padrão de virulência diferente nas linhas quase isogênicas de CO39, indicando a utilidade desses isolados diferenciadores para incorporação de genes de resistência nas cultivares suscetíveis.



**Fig. 2.** Padrão de bandas da análise de DNA com os primers *Pot2* pelo método rep-PCR, de isolados de *Pyricularia grisea* coletados de quatro lavouras comerciais distintas da cultivar Metica-1 no Estado do Tocantins. M = Marcador molecular, Lambda 100 pb, (Gibco BRL). Os números dos isolados correspondem aos mesmos números do dendrograma.

Seis grupos distintos foram identificados considerando coeficientes de similaridades que variaram de 0,09 a 1,0 (Figura 3). As similaridades dentro do grupo, em média, são maiores do que entre grupos. Alguns isolados identificados como patótipo ID-14 mostraram similaridades menores que 70%. A distribuição de isolados dentro do dendrograma não correspondeu ao padrão de virulência. Entretanto, os isolados pertencentes ao patótipo ID-14 formaram relativamente um grupo mais diferenciado do que os outros, com valores de coeficientes de similaridades variando de 0,66 a 1,0. As similaridades dentro dos grupos I e II, com exceção de um isolado, foi maior que 0,82. Os seis grupos identificados foram compostos por mais de um patótipo. Os



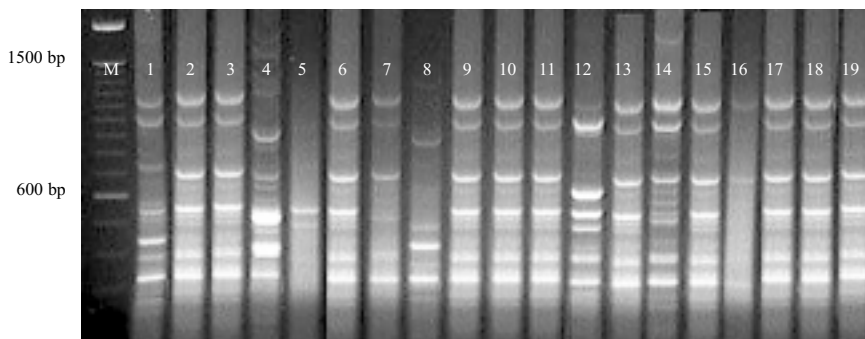
**Fig. 3.** Dendrograma construído pelo método UPGMA de 87 isolados de *Pyricularia grisea* (1-87) provenientes da cultivar de arroz Metica-1, baseado no coeficiente de similaridade Jaccard aplicado aos dados da análise genotípica de DNA Fingerprinting (primer *Pot2* rep-PCR); os isolados estão indicados pelos números respectivos.

estudos de estrutura genética dos isolados de *P. grisea* utilizando a sonda MGR 586 demonstraram que, embora cada isolado tenha apresentado um perfil típico, eles foram agrupados em linhagens distintas (Levy et al., 1991; Correa-Victoria & Zeigler, 1993). O relacionamento simples entre linhagens e patótipos foi originalmente postulado, mas estudos posteriores mostraram diversidade de virulência dentro de linhagens (Zeigler et al., 1995). A análise genética utilizando rep-PCR não pode ser utilizada com segurança para determinar patótipos de fungo, porque não existe correspondência entre agrupamento baseado em rep-PCR e patótipos (Zeigler et al., 1995; Prabhu et al., 2002). Entretanto, a análise com rep-PCR é uma ferramenta importante para diferenciação genética dos isolados que mostram reações fenotípicas ambíguas nas diferenciadoras, ou padrões de virulência distintos.

A diversidade de virulência e o padrão de virulência das populações de *P. grisea* coletadas de lavouras comerciais de Metica-1 foram estreitos. A estreita diversidade da população do patógeno pode ser atribuída à seleção estabilizadora (Van Der Plank, 1982) a favor de patótipos como ID-14.

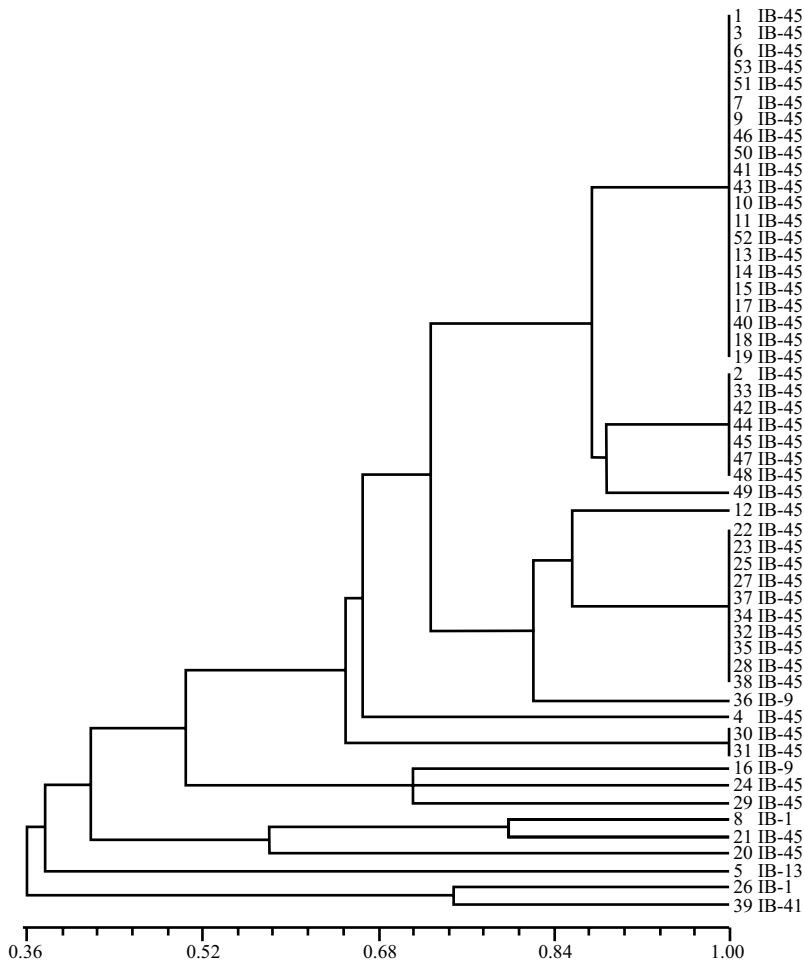
## Epagri 108 e Epagri 109

Foi gerado um padrão de bandas distinto que variou de 200bp a 1300 bp de comprimento, utilizando elementos repetitivos (rep) amplificados por reação de polimerase em cadeia (rep-PCR), com duas seqüências de primer *Pot2*. Todos os isolados de *P. grisea* coletados das cultivares Epagri 108 e Epagri 109 mostraram de 3 a 9 bandas polimórficas. Em uma amostra de 19 isolados, três identificados pelos números 5, 8 e 16, e patótipos IB-13, IB-1 e IB-9, respectivamente, mostraram diferenças no perfil de DNA, comparado com 16 outros isolados pertencentes ao patótipo predominante IB-45 (Figura 4).



**Fig. 4.** Análise dos padrões de bandas formados com DNA, rep-PCR *Pot2*, dos isolados de *Pyricularia grisea* coletados das cultivares Epagri 108 e 109. M = Marcador Lambda 100 pb, Gibco BRL. O número de cada amostra representa o mesmo isolado no dendrograma.

A análise de agrupamento de 53 isolados mostrou dois grupos distintos de bandas polimórficas (Figura 5). Quarenta dos 47 isolados do patótipo IB-45, obtidos das cultivares Epagri 108 e Epagri 109, formaram um grupo (grupo I), considerando 70% de coeficiente de similaridade. O restante dos isolados pertenceram ao grupo II, que não apresentou padrões bem definidos, sendo subdividido em seis subgrupos, cada um composto de um a três isolados.



**Fig. 5.** Dendrograma construído pelo método UPGMA de 53 isolados de *Pyricularia grisea* coletados das cultivares de arroz Epagri 108 e Epagri 109 com base no coeficiente de similaridade de Jaccard; dados da análise de rep-PCR *Pot2*; escala representa coeficiente de similaridade.

Não houve uma relação direta entre os agrupamentos estabelecidos pela análise de rep-PCR e patótipos, como reportado anteriormente; entretanto, Zeigler et al. (1995) encontraram uma possível correspondência entre a análise genética e de virulência fenotípica. Foi evidenciada diversidade genética no grupo II de isolados, embora não tenha sido possível detectar variabilidade para virulência fenotípica, indicando a importância da análise de rep-PCR.

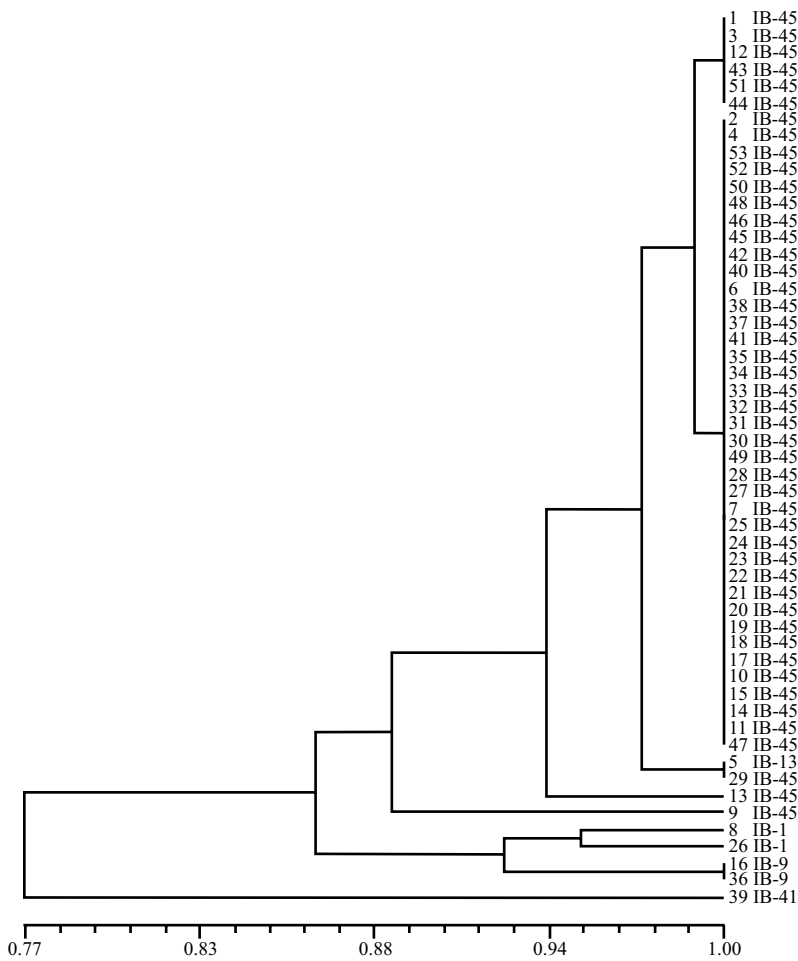
As similaridades para virulência fenotípica entre os 53 isolados de *P. grisea* são apresentadas na Figura 6. Foi possível diferenciar somente um grupo, considerando 77% de coeficiente de similaridade, com exceção do isolado 39, pertencente ao patótipo IB-41. O patótipo predominante IB-45 foi representado por 47 dos 53 isolados, correspondendo a 88,7% do total dos patótipos identificados.

Os patótipos IB-1, IB-9, IB-41 e IB-13 foram encontrados em baixa frequência nas diferentes lavouras de Epagri 108 e Epagri 109. É interessante observar que a ocorrência destes quatro patótipos foi relatada em cultivares de arroz de terras altas por Prabhu & Filippi (1989). Estes autores identificaram sete patótipos entre 24 isolados coletados no viveiro nacional de brusone e nos campos experimentais.

O patótipo IB-45, relatado como predominante nas lavouras das cultivares Epagri 108 e Epagri 109 no Estado de Tocantins, também foi identificado nas cultivares do sistema irrigado CICA-8 e Oryzica-L5 (Filippi et al., 1999). Estes resultados demonstraram a existência de compatibilidade do patótipo IB-45, em baixa frequência, com as cultivares do sistema irrigado, explicando a ocorrência da epidemia de brusone pelo aumento brusco da frequência deste patótipo, facilitado pela ausência de resistência destas cultivares a este patótipo específico.

Os resultados da análise dos patótipos e o agrupamento baseado na análise de rep-PCR estão resumidos na Tabela 4. Todos os 53 isolados coletados das cultivares Epagri 108 e Epagri 109 mostraram o mesmo padrão de reação, com poucas exceções, quando inoculados nas oito diferenciadoras internacionais.

Os conídios derivados de diferentes lesões L11, LI6 e L5<sup>2</sup> (os números em expoente indicam o número do monospórico) na mesma folha, respectivamente, da cultivar Epagri 109 da Lavoura I foram classificados no grupo II pela análise



**Fig. 6.** Dendrograma construído pelo método UPGMA utilizando 53 isolados de *Pyricularia grisea* coletados das cultivares de arroz Epagri 108 e Epagri 109, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard e dados da análise de virulência fenotípica; isolados identificados por número, seguido do respectivo patótipo.

de rep-PCR. Por outro lado, o mesmo patótipo IB-45, identificado a partir de diferentes isolados monospóricos, obtidos da mesma lesão da cultivar Epagri 108 (EP108L3<sup>2</sup>, EP108L3<sup>3</sup>, EP108L3<sup>4</sup>, EP108L3<sup>5</sup>) e de diferentes lesões (EP108L1, EP108L2, EP108L3, EP108L4) da mesma lavoura (V) foram encontrados nos grupos I e II, pela análise de rep-PCR (Tabela 4).



**Tabela 4.** Origem, patótipos e grupos de *Pyricularia grisea* baseados na análise de rep-PCR de isolados coletados das cultivares de arroz Epagri 108 e Epagri 109.

| Número <sup>1</sup> | Nº:ACC | Identificação <sup>3</sup> | Origem <sup>4</sup> | Patótipo <sup>5</sup> | Grupo Rep-PCR <sup>6</sup> |
|---------------------|--------|----------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1                   | 1634   | EP109L2 <sup>1</sup> -99   | L1                  | IB-45                 | I                          |
| 2                   | 1636   | EP109L4 <sup>1</sup> -99   | L1                  | IB-45                 | I                          |
| 3                   | 1637   | EP109L5 <sup>1</sup> -99   | L1                  | IB-45                 | I                          |
| 4                   | 1638   | EP109L5 <sup>2</sup> -99   | L1                  | IB-45                 | II                         |
| 5                   | 1639   | EP109L6 <sup>1</sup> -99   | L1                  | IB-13                 | II                         |
| 6                   | 1641   | EP109L8 <sup>1</sup> -99   | L1                  | IB-45                 | I                          |
| 7                   | 1642   | EP109L9 <sup>1</sup> -99   | L1                  | IB-45                 | I                          |
| 8                   | 1644   | EP109L11 <sup>1</sup> -99  | L1                  | IB-1                  | II                         |
| 9                   | 1645   | EP108L1 <sup>1</sup> -99   | L2                  | IB-45                 | I                          |
| 10                  | 1647   | EP108L3 <sup>1</sup> -99   | L2                  | IB-45                 | I                          |
| 11                  | 1648   | EP108L3 <sup>2</sup> -99   | L2                  | IB-45                 | I                          |
| 12                  | 1650   | EP108L4 <sup>1</sup> -99   | L2                  | IB-45                 | I                          |
| 13                  | 1652   | EP108L4 <sup>3</sup> -99   | L2                  | IB-45                 | I                          |
| 14                  | 1653   | EP108L5 <sup>1</sup> -99   | L2                  | IB-45                 | I                          |
| 15                  | 1657   | EP108L71 <sup>1</sup> -99  | L1                  | IB-45                 | I                          |
| 16                  | 1658   | EP108L1 <sup>1</sup> -99   | L3                  | IB-9                  | II                         |
| 17                  | 1659   | EP108L2 <sup>1</sup> -99   | L3                  | IB-45                 | I                          |
| 18                  | 1662   | EP108L5 <sup>1</sup> -99   | L3                  | IB-45                 | I                          |
| 19                  | 1664   | EP108L1 <sup>2</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | I                          |
| 20                  | 1665   | EP108L2 <sup>1</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | II                         |
| 21                  | 1667   | EP108L2 <sup>3</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | II                         |
| 22                  | 1669   | EP108L3 <sup>2</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | I                          |
| 23                  | 1670   | EP108L3 <sup>3</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | I                          |
| 24                  | 1671   | EP108L3 <sup>4</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | II                         |
| 25                  | 1672   | EP108L3 <sup>5</sup> -99   | L5                  | IB-45                 | I                          |
| 26                  | 1673   | EP108L4 <sup>2</sup> -99   | L5                  | IB-1                  | II                         |
| 27                  | 1676   | EP108L1 <sup>1</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | I                          |
| 28                  | 1680   | EP108L5 <sup>1</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | I                          |
| 29                  | 1682   | EP108L6 <sup>1</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | II                         |
| 30                  | 1683   | EP108L6 <sup>2</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | II                         |
| 31                  | 1684   | EP108L6 <sup>7</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | II                         |
| 32                  | 1687   | EP108L8 <sup>3</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | I                          |
| 33                  | 1688   | EP108L9 <sup>1</sup> -99   | L6                  | IB-45                 | I                          |
| 34                  | 1689   | EP109L1 <sup>1</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |
| 35                  | 1690   | EP109L1 <sup>3</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |
| 36                  | 1692   | EP109L2 <sup>1</sup> -99   | L7                  | IB-9                  | I                          |
| 37                  | 1693   | EP109L2 <sup>2</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |

Continua...

Continuação... **Tabela 4.**

| Número <sup>1</sup> | N.ºACC | Identificação <sup>3</sup> | Origem <sup>4</sup> | Patótipo <sup>5</sup> | Grupo Rep-PCR <sup>6</sup> |
|---------------------|--------|----------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------------|
| 38                  | 1695   | EP109L3 <sup>2</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |
| 39                  | 1696   | EP109L4 <sup>1</sup> -99   | L7                  | IB-41                 | II                         |
| 40                  | 1697   | EP109L4 <sup>2</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |
| 41                  | 1698   | EP109L4 <sup>3</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |
| 42                  | 1699   | EP109L5 <sup>1</sup> -99   | L7                  | IB-45                 | I                          |
| 43                  | 1700   | EP109L1 <sup>1</sup> -99   | L11                 | IB-45                 | I                          |
| 44                  | 1701   | EP109L1 <sup>2</sup> -99   | L11                 | IB-45                 | I                          |
| 45                  | 1703   | EP109L2 <sup>1</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 46                  | 1704   | EP109L2 <sup>2</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 47                  | 1707   | EP109L3 <sup>2</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 48                  | 1708   | EP109L4 <sup>1</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 49                  | 1711   | EP109L5 <sup>2</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 50                  | 1712   | EP109L6 <sup>1</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 51                  | 1713   | EP109L6 <sup>2</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 52                  | 1714   | EP109L7 <sup>1</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |
| 53                  | 1716   | EP109L1 <sup>1</sup> -99   | L13                 | IB-45                 | I                          |

<sup>1</sup>Número de série; <sup>2</sup>Número de acesso do isolado de *P. grisea* na coleção da Embrapa Arroz e Feijão; <sup>3</sup>EP refere-se a Epagri, L indica número da lesão, elevado ao número que indica o monospórico deste isolamento, os dois últimos dígitos indicam o ano da coleção; <sup>4</sup>número da lavoura da qual o isolado foi coletado; <sup>5</sup>Patótipos foram identificados com base na reação das oito diferenciadoras internacionais; <sup>6</sup>grupos baseados em análise dos padrões de bandas pelo método de rep-PCR.

O padrão de virulência dos isolados do grupo II, identificados pela análise de rep-PCR nos 32 genótipos encontra-se na Tabela 5. Quatro patótipos (IB-1, IB-9, IB-13 e IB-41) foram identificados nas cultivares Epagri 108 e Epagri 109 em diferentes lavouras. Eles mostraram diferenças de virulência nas linhagens quase isogênicas da cultivar CO39. Também, todos os 53 isolados de *P. grisea* testados foram avirulentos (100%) aos genes *Pi-1* (C101LAC) e *Pi-2* (C101A51) e virulentos a *Pi-3* (C104PKT), *Pi-4a*(C101PKT) e *Pi-4b* (C105TTP4L). Os genes *Pi-1* e *Pi-2* podem ser incorporados nas cultivares suscetíveis à brusone, como Rio Formoso, Epagri 108 e Epagri 109. A reação de 13 isolados nas nove cultivares comerciais de arroz foi similar, com exceção do isolado 39, identificado como patótipo IB-41 (Tabela 5). As cultivares comerciais Aliança e BR-IRGA 409, assim como a cv. Tetep, utilizada como testemunha resistente, mostraram reação suscetível.

**Tabela 5.** Análise de virulência, em 32 genótipos de arroz, dos isolados de *Pyricularia grisea* que apresentaram padrões diferenciados de bandas quando amplificados por rep-PCR (grupo II).

| Genótipo              | Isolados <sup>1</sup> |       |       |      |       |       |       |       |      |       |       |       |      |  |
|-----------------------|-----------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|--|
|                       | 8 <sup>2</sup>        | 5     | 39    | 26   | 21    | 20    | 29    | 24    | 16   | 31    | 30    | 4     | 36   |  |
|                       | 1644 <sup>3</sup>     | 1639  | 1696  | 1673 | 1667  | 1665  | 1682  | 1671  | 1658 | 1684  | 1683  | 1638  | 1692 |  |
| Epagri 108            | S <sup>4</sup>        | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Epagri 109            | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Rio Formoso           | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Metica-1              | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Cica-8                | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Cica-9                | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Aliança               | R                     | R     | S     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| BR-IRGA 409           | R                     | R     | S     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Javaé                 | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| IR-8                  | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| IR-36                 | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| IR-50                 | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Basmati-370           | R                     | R     | S     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Colômbia-1            | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Oryzica-5             | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Tetep                 | R                     | R     | S     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Yashiro mochi         | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Maratelli             | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| C 101 LAC             | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| C 101 A 51            | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| C 104 PKT             | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| C 101 PKT             | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| C 105 TTP4L           | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| C039                  | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Raminad               | R                     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Zenith                | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| NP 125                | S                     | S     | R     | S    | R     | R     | R     | R     | S    | R     | R     | R     | S    |  |
| Usen                  | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Dular                 | S                     | R     | R     | S    | R     | R     | R     | R     | R    | R     | R     | R     | R    |  |
| Kanto                 | S                     | R     | S     | S    | R     | R     | R     | R     | S    | R     | R     | R     | S    |  |
| Sha tio tsao          | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Caloro                | S                     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S     | S    | S     | S     | S     | S    |  |
| Patótipo <sup>5</sup> | IB-1                  | IB-13 | IB-41 | IB-1 | IB-45 | IB-45 | IB-45 | IB-45 | IB-9 | IB-45 | IB-45 | IB-45 | IB-9 |  |

<sup>1</sup>Culturas monospóricas isoladas das cultivares Epagri 108 e 109, de nove lavouras diferentes.

<sup>2</sup>Os números referem-se a isolados identificados no dendrograma.

<sup>3</sup>Número de acesso do isolado de *P. grisea* na coleção da Embrapa Arroz e Feijão.

<sup>4</sup>S = reação suscetível; R = reação resistente.

<sup>5</sup>Patótipos foram identificados baseando-se na reação das diferenciadoras internacionais.

O patótipo IB-45 foi altamente virulento na cultivar Rio Formoso (17719/5738/IR 21015-72-3-3-3-1), que possui o mesmo pedigree que a cultivar Epagri 108 (17719/5738/IR 21015-72-3-3-3-1). A resistência desta cultivar foi superada após um ano de seu lançamento pela Embrapa Arroz e Feijão.

As populações de *P. grisea* que foram avirulentas a alguns genótipos no campo encontram-se relacionados na Tabela 5 e poderão ser utilizadas como progenitores nos cruzamentos com cultivares comerciais.

A análise molecular utilizando sonda MGR586, de 64 isolados brasileiros de *P. grisea*, coletados de cultivares de arroz irrigado e de terras altas, em campos experimentais, mostraram que todos os isolados pertencem a 18 linhagens distintas e a 15 patótipos. Estes estudos ainda mostraram que os isolados de CICA-8 e Metica-1 pertencem a duas linhagens distintas, BZ-A e BZ-10, respectivamente, indicando alta especificidade destes isolados à cultivar, em condições de campo (Filippi et al., 1996, 1999).

Os resultados do presente trabalho mostraram que há uma especificidade dos isolados de *P. grisea* à cultivar de origem, como indicado pela maior frequência do patótipo IB-45, embora quatro outros patótipos também tenham sido identificados. A capacidade do patógeno para se adaptar à cultivar é imensa. Quando uma cultivar com resistência vertical e genes maiores é introduzida em um outro ambiente, como aconteceu com a cultivar Epagri 108, a população do patógeno neste novo ambiente não possui genes de avirulência para combinar com genes de resistência apresentados pela cultivar. A resistência de Epagri foi selecionada para atuar em outra população do patógeno. Por outro lado, a população local do patógeno não possuía genes de avirulência para reconhecer os genes de resistência desta cultivar. A pressão de seleção exercida neste ambiente foi negativa para este(s) gene(s) de avirulência, causando a virulência acumulada, evento que torna a cultivar suscetível (Van Der Plank, 1982).

Da mesma forma, a mutação genética responsável por alterações na molécula de DNA do patógeno causa uma mudança nos genes de avirulência, que perdem a especificidade com o gene de resistência do hospedeiro, tornando este indivíduo virulento. Assim, a epidemia de brusone no Estado de Tocantins pode ser atribuída à ocorrência do patótipo IB-45, ou à sua pré-existência, em baixa frequência, que aumentou em larga escala devido à forte

pressão de seleção, quando Epagri 108 e Epagri 109 foram introduzidas ou, ainda, à capacidade competitiva do patótipo IB-45.

## Conclusões

1. A diversidade de virulência nas populações de *Pyricularia grisea* coletadas das cultivares Metica-1, Epagri 108 e Epagri 109, é estreita.
2. O padrão de virulência entre populações de *P. grisea*, coletadas em diferentes lavouras de Metica-1, é semelhante.
3. Não há relação entre agrupamentos definidos por rep-PCR e patótipos, dos isolados coletados das cultivares Metica-1, Epagri 108 e Epagri 109.

## Referências Bibliográficas

AMARAL, R. E. de M.; SOUZA, D. M. de; MALAVOLTA, V. M. A.; ISSA, E. Raças fisiológicas de *Pyricularia grisea* Cav. no Estado de São Paulo. **O Biólogo**, São Paulo, v. 45, n. 11/12, p. 205-208, nov./dez. 1979.

ATKINS, J. G.; ROBERT, A. L.; ADAIR, C. R.; GOTO, K.; KOZAKA, T.; YANAGIDA, R.; YAMADA, M.; MATSUMOTO, S. An international set of rice varieties for differentiating races of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 57, n. 3, p. 297-301, Mar. 1967.

BEDENDO, I. P.; RIBEIRO, A. S.; CARDOSO, C. O. N. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* cav. agente da brusone no arroz. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 5, n. 1/2, p. 106-109, jan./jun. 1979.

BONMAN, J. M.; VERGEL DE DIOS, T. I.; BANDONG, J. M.; LEE, E. J. Pathogenic variability of monoconidial isolates of *Pyricularia oryzae* in Korea and in the Philippines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 71, n. 2, p. 127-130, Feb. 1987.

CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot-spot" breeding site in Eastern Colombia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, n. 10, p. 1029-1035, Oct. 1993.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S.; LEVY, M. Espectro de virulência de isolados e linhagens de *Pyricularia grisea* em arroz. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 398, ago. 1996. Suplemento, ref. 383. Edição de Resumos do XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Campo Grande, MS, ago. 1996.

FILIPPI, M. C.; PRABHU, A. S.; LEVY, M. Differential compatibility of *Pyricularia grisea* isolates with some Brazilian irrigated rice cultivars. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, n. 3, p. 447-450, Set. 1999.

GEORGE, M. L. C.; NELSON, R. J.; ZEIGLER, R. S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequence. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, n. 3, p. 223-228, Mar. 1998.

GIATGONG, P.; FREDERIKSEN, R. A. Pathogenic variability and cytology of monoconidial subcultures of *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 59, n. 8, p. 1152-1157, Aug. 1969.

HAMER, J. E. Molecular probes for rice blast disease. **Science**, Washington, v. 252, n. 5006, p. 632-633, May 1991.

KACHROO, P.; LEONG, S. A.; CHATTOO, B. B. *Pot2*, an inverted repeat transposon from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 245, n. 3, p. 339-348, Nov. 1994.

LEUNG, H.; BORROMEO, E. S.; BERNARDO, M. A.; NOTTEGHEM, J. L. Genetic analysis of virulence in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 9, p. 1227-1233, Sept. 1988.

LEVY, M.; CORREA-VICTORIA, F. J.; ZEIGLER, R. S.; XU, S.; HAMER, J. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1427-1433, Dec. 1993.

LEVY, M.; ROMAO, J.; MARCHETTI, M. A.; HAMER, J. E. DNA fingerprinting with a dispersed repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, n. 1, p. 95-102, Jan. 1991.

OU, S. H. Pathogenic variability and host resistance of the rice blast fungus, *Pyricularia grisea* Cavara. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 167-187, 1980.

OU, S. H.; AYAD, M. R. Pathogenic races of *Pyricularia oryzae* originating from single lesions and monoconidial cultures. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, n. 2, p. 179-182, Feb. 1968.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. As raças fisiológicas de *Pyricularia oryzae* virulentas nas cultivares melhoradas de arroz de sequeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 14, n. 2, p. 140. Jul. 1989. Suplemento, ref. 168. Edição de Resumos do XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Recife, PE, jul. 1989.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Padrão de virulência dos isolados de *Pyricularia grisea* provenientes da cultivar Epagri 108, de lavouras de arroz. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, p. 319, ago. 1999. Suplemento, ref. 439. Edição de Resumos do XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Curitiba, PR, ago. 1999.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Graus de resistência a brusone e produtividade de cultivares melhoradas de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 12, p. 1453-1459, dez. 2001.

PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C.; ARAÚJO, L. G.; FARIA, J. C. Genetic and phenotypic characterization of isolates of *Pyricularia grisea* from the rice cultivars Epagri 108 and 109 in the state of Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, n. 6, p. 566-573, nov./dez. 2002.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RIBEIRO, A. S.; TERRES, A. L. S. Variabilidade do fungo *Pyricularia oryzae* e sua relação com cultivares resistentes à brusone. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 12, n. 4, p. 316-321, dez. 1987.

URASHIMA, A. S.; ISOGAWA, Y. Identification of races of *Pyricularia oryzae* causing blast disease in variety IAC 4440 in Paraíba Valley - SP. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 16, n. 3/4, p. 243-247, jul./dez. 1990.

VAN DER PLANK, J. E. **Host-pathogen interaction in plant disease**. London: Academic Press, 1982. 207 p.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGELYS, V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

ZEIGLER, R. S.; COUC, L. X.; SCOTT, R. P.; BERNARDO, M. A.; CHEN, D. H.; VALENT, B.; NELSON, R. J. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopatology**, St. Paul, v. 85, n. 4, p. 443-451, Apr. 1995.